

# Physiological role of cytoplasmic fatty acid-binding protein for the cardiac myocyte

Citation for published version (APA):

Schaap, F. G. (1999). *Physiological role of cytoplasmic fatty acid-binding protein for the cardiac myocyte*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19990701fs>

## Document status and date:

Published: 01/01/1999

## DOI:

[10.26481/dis.19990701fs](https://doi.org/10.26481/dis.19990701fs)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

Contraction of the heart generates the pressure for adequate blood flow through the circulatory system. In this regard, the heart plays an essential role in delivering nutrients and oxygen to organs, and in removing cellular waste products. Cardiac force is developed by myocytes which use ATP for contraction and relaxation of the myofibrils. Cardiac myocytes preferentially use long-chain fatty acids (LCFAs) as a substrate for energy production, *i.e.* ATP regeneration.

Although LCFAs are essentially insoluble in aqueous solution, these compounds are found to be extracted with high efficiency from the coronary circulation. Proteins capable of binding LCFAs are implicated in the transport of LCFAs in the vascular compartment, and in the various transport steps which precede the oxidation of LCFAs in the mitochondria of the cardiac myocyte. While albumin is the fatty acid carrier in blood plasma and the interstitium, both translocation of LCFAs across the cellular membrane and transfer of LCFAs through the cytoplasmic compartment are thought to be mediated by membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins (FABPs), respectively. The studies described in this thesis sought to determine the role of cytoplasmic FABP for the cardiac myocyte.

A brief introduction to cardiac LCFA utilization and an outline of the thesis are presented in *Chapter 1*. Prior to mitochondrial oxidation in the cardiac myocyte, LCFAs must pass several cellular barriers and aqueous compartments. Long-thought to result from simple, passive diffusion through the membrane phospholipid bilayer, LCFAs are now known to be taken up by cells through a carrier-mediated mechanism as well. In the heart, three membrane-associated FABPs, including fatty acid-transport protein (FATP), have been implicated in carrier-mediated translocation of LCFAs across the cell membrane. In the cardiac myocyte, cytoplasmic heart-type FABP (H-FABP) is thought to facilitate the cellular uptake and intracellular transport of LCFAs. The hypothesized roles of membrane-associated FABPs and of H-FABP in cardiac LCFA utilization are reviewed in *Chapter 2*.

H-FABP is a member of the family of intracellular lipid-binding proteins (iLBPs) whose expression appears restricted to higher eukaryotes. Reconstruction of the evolution of this protein family (*Chapter 3*) suggests that an ancestral iLBP gene arose at least 950 millions of years ago. Duplication of such ancestral gene and diversification of the products eventually gave rise to the 14 iLBP types currently found in vertebrates. Phylogenetic analysis revealed the presence of four groups of iLBPs with distinct ligand-binding properties. Different iLBPs may have evolved to accomplish cytoplasmic transport of a range of distinct hydrophobic compounds.

For studying the role of H-FABP *in vitro*, two new methods have been developed (*Chapter 4*). A chromatographic procedure was designed to obtain vast amounts of pure H-FABP. For this purpose, rat H-FABP was expressed in *Escherichia coli*. Using anion exchange chromatography of cell lysates, rat H-FABP could be purified to homogeneity in a single step. This high-level recombinant

expression and simple purification strategy readily yields sufficient quantities of pure rat H-FABP (30–40 mg per liter culture) for *in vitro* studies.

With the availability of H-FABP nullizygous mice, a method for isolating adult mouse cardiac myocytes was highly desirable. Published protocols for obtaining these cells from mouse heart appeared to yield insufficient amounts of cells for metabolic studies. The newly-developed method (*Chapter 4*) allows the isolation of relatively large amounts of cardiac myocytes (40–50 mg cellular mass per adult mouse heart). Cell preparations contain on average 45% viable cells as based on morphology and dye exclusion. Moreover, these cells show rhythmical contractions upon electrical stimulation.

Rat FATP cDNA was cloned to initiate studies on the role of this integral membrane protein in myocardial LCFA uptake (*Chapter 5*). The deduced amino acid sequence of rat FATP was found to be highly homologous with mouse FATP (97% amino acid identity), and comparison with putative orthologues from more distantly related species revealed several highly conserved regions. One of these, the so-called AMP-binding domain motif, which is frequently found in enzymes forming an adenylated intermediate as part of their catalytic cycle, is fully conserved between rat FATP and the putative yeast orthologue. Assuming that the AMP-binding domain resides on a cytoplasmic segment of the protein, two models depicting the membrane topology of rat FATP were created.

Cardiac LCFA utilization was studied in mice with a disrupted H-FABP gene (*Chapter 6*). Hearts of H-FABP<sup>-/-</sup> mice expressed wild-type levels of mRNAs coding for sarcolemmal LCFA transporters, and in studies on heart homogenates it was found that these mice maintained the full capacity to oxidize octanoate and palmitate. Furthermore, the absence of H-FABP in hearts of H-FABP<sup>-/-</sup> mice was not counteracted by expression of other FABP types, and did not evoke subcellular relocalization of mitochondria. This inventory indicated that adaptations to compensate the absence of H-FABP in hearts of H-FABP<sup>-/-</sup> mice did most likely not occur, making these mice particularly suitable for studying the role of H-FABP in myocardial LCFA consumption. To this end, both uptake and oxidation of fatty acids by isolated cardiac myocytes was studied.

H-FABP<sup>-/-</sup> cardiac myocytes showed a diminished rate of palmitate uptake (-45%) and palmitate oxidation (-45%) when compared with wild-type cells. The effect appeared specific for LCFAs, as the rate of uptake of the medium-chain fatty acid octanoate was identical in wild-type and H-FABP<sup>-/-</sup> cardiac myocytes. Moreover, contracting wild-type cardiac myocytes attained an elevated rate (+95%) of palmitate oxidation when compared with quiescent cells, while H-FABP<sup>-/-</sup> cardiac myocytes were unable to achieve a higher rate of palmitate oxidation following electrical stimulation.

Because the absence of H-FABP was apparently not compensated, these experiments indicate that H-FABP mediates the uptake and oxidation of LCFAs by cardiac myocytes. Hence, H-FABP is facilitating bulk transport of LCFAs in the cytoplasmic compartment of the cardiac myocyte. The absence of H-FABP in H-FABP<sup>-/-</sup> cardiac myocytes limits their extent to utilize LCFAs. For their energy production, these cells may depend more heavily on carbohydrates, as suggested by an increased rate of glucose oxidation by H-FABP<sup>-/-</sup> cardiac myocytes (+80%) and an elevated cardiac glycogen content (+60%), when compared with wild-type cells or hearts.

A general discussion of the studies described in this thesis, including a recapitulation of significant findings, and possible directions for future investigations, are given in *Chapter 7*.

# ***SAMENVATTING***

Door samentrekking van de hartspier kan bloed door het bloedvatstelsel stromen. Het bloed bevat ondermeer rode bloedcellen, met daarin eiwitten bevatten die zuurstof en koolstofdioxide (een afvalproduct) binden, en voedingsstoffen zoals glucose en vetzuren. Het hart speelt dus een essentiële rol bij de toevoer van voedingsstoffen en zuurstof naar organen, en de afvoer van aldaar gevormde stofwisselingsproducten. Het samentrekken van het hart wordt mogelijk gemaakt door contractie van de hartspiercellen (cardiomyocyten). Hiertoe gebruiken deze cellen de energie-rijke verbinding ATP om de contractiele eiwitten te laten samentrekken en te ontspannen. Tijdens dit proces wordt ATP omgezet in de energie-arme verbinding ADP. De energie die nodig is om ATP uit ADP te regenereren wordt verkregen door voedingsstoffen te verbranden (oxidatie). Hartspiercellen gebruiken hiertoe bij voorkeur lang-ketenige vetzuren (LCFAs, long-chain fatty acids).

LCFAs zijn zeer slecht oplosbaar in waterig milieu zoals het bloed. Toch worden deze verbindingen met grote efficiëntie opgenomen vanuit de kransslagaderen (de bloedvaten die het hart van bloed voorzien). Voordat LCFAs verbrand worden in de mitochondria (de 'energiecentrales') van de cardiomyocyt, moeten deze verbindingen een aantal cellulaire barrières, zoals de endotheel cellaag van de haarvaten, en een aantal waterige compartimenten, zoals het cytoplasma van de cardiomyocyt, passeren. Eiwitten, die in staat zijn LCFAs te binden, worden verondersteld betrokken te zijn bij de diverse stappen in dit proces. Het plasma eiwit albumine transporteert LCFAs in het bloed en in de interstitiële vloeistof, terwijl het transport van LCFAs over de celmembraan én het transport van LCFAs door de celvloeistof (cytoplasma) waarschijnlijk gemedieerd worden door vetzuur-bindende eiwitten (FABPs, fatty acid-binding proteins) die respectievelijk geassocieerd zijn met de celmembraan of in het cytoplasma voorkomen. De studies die in dit proefschrift beschreven worden, hadden tot doel de fysiologische rol van cytoplasmatisch FABP voor de hartspiercel vast te stellen.

Een beknopte inleiding in het gebruik van LCFAs door de hartspier, alsmede de opzet van dit proefschrift worden besproken in *Hoofdstuk 1*. Passieve diffusie van LCFAs door de fosfolipide bi-laag werd lang gezien als het mechanisme verantwoordelijk voor de cellulaire opname van LCFAs. Recent is aangetoond dat eiwit-gemedieerde opname van vetzuren eveneens een belangrijke rol speelt in dit proces. In het hart zijn drie membraan-geassocieerde eiwitten aangetroffen, waaronder FATP (fatty acid-transport protein, vetzuur-transporterend eiwit), die waarschijnlijk een rol spelen bij eiwit-gemedieerde translocatie van LCFAs over de celmembraan. Daarnaast komt in het cytoplasma van de cardiomyocyt een eiwit voor (H-FABP, hart-type FABP) dat mogelijk zowel de cellulaire opname van LCFAs als het intracellulaire transport van LCFAs bevordert. In *Hoofdstuk 2* wordt een overzicht gegeven van de mogelijke rollen die membraan-geassocieerde FABPs en H-FABP spelen bij de opname en het gebruik van vetzuren door het hart.

H-FABP behoort tot de familie van intracellulaire lipide-bindende eiwitten (iLBPs). Deze eiwitten komen, voor zover nu bekend is, alleen voor in hogere eukaryoten (gewervelde en ongewervelde dieren). De evolutie van de iLBP familie is gereconstrueerd (*Hoofdstuk 3*) en laat zien dat een gemeenschappelijk iLBP gen minimaal 950 miljoen jaar geleden is ontstaan. Door duplicatie van dit oergen en ontstaan van verscheidenheid in de gedupliceerde genen, ontstonden uiteindelijk de 14 verschillende iLBP types die momenteel geïdentificeerd zijn in gewervelde dieren. De 14 iLBP types zijn onder te verdelen in vier groepen die elk een karakteristieke reeks liganden kunnen binden. Mogelijk zijn de diverse iLBP types ontstaan om cytoplasmatisch transport van een breed scala aan hydrofobe ('vet-achtige') verbindingen te bewerkstelligen.

Om de rol van H-FABP *in vitro* te kunnen bestuderen zijn twee nieuwe technieken ontwikkeld (*Hoofdstuk 4*). Allereerst is een chromatografische methode opgezet om relatief grote hoeveelheden zuiver H-FABP te verkrijgen. Hiertoe is rat H-FABP cDNA tot expressie gebracht in de bacterie *Escherichia coli*. Met behulp van anion-uitwisselings chromatografie van cellysaten, kon rat H-FABP in één stap worden opgezuiverd. De combinatie van recombinant expressie en een efficiënte zuiveringsprocedure levert op eenvoudige wijze relatief grote hoeveelheden zuiver rat H-FABP (30-40 mg per liter medium) voor *in vitro* onderzoek.

Recent zijn door onderzoekers in Berlijn muizen ontwikkeld die de genetische informatie missen om H-FABP te kunnen maken (zogenaamde H-FABP knock-out muizen). Om de functie van H-FABP te kunnen bestuderen is een protocol ontwikkeld om cardiomyocyten te isoleren uit het hart van volwassen muizen. De in de literatuur beschreven methodiek leverde namelijk te weinig cellen op om metabole studies te kunnen verrichten. De nieuw ontwikkelde techniek (*Hoofdstuk 4*) maakt het mogelijk om relatief grote hoeveelheden cardiomyocyten te isoleren (ongeveer 40-50 mg cellen per muizenhart). Op grond van morfologische kenmerken en het buitensluiten van een kleurstof, blijken de verkregen preparaten gemiddeld 45% intacte cellen te bevatten. Als de cellen electrisch geprikkeld worden gaan ze bovendien samentrekken.

Om in de toekomst de interactie tussen H-FABP en het integrale membraan eiwit FATP in relatie tot vetzuurgebruik door het hart nader te kunnen bestuderen, is rat FATP cDNA gecloneerd (*Hoofdstuk 5*). De van het cDNA afgeleide eiwitsequentie laat zien dat rat FATP grote homologie vertoont met muis FATP (97% identieke aminozuren). Door rat FATP te vergelijken met orthologe eiwitten uit ver verwante organismen zijn sterk geconserveerde domeinen waargenomen. Eén van deze domeinen, het zogenaamde AMP-bindend motief, is volledig geconserveerd tussen rat FATP en het vermoedelijke gist FATP ortholoog. Het AMP-bindend motief wordt vaak aangetroffen in enzymen die een geadenyleerd tussenproduct vormen als onderdeel van hun katalytisch mechanisme. Ervan uitgaande dat dit domein een cytoplasmatische localisatie heeft, zijn twee modellen voor de membraantopologie van rat FATP opgesteld.



In studies beschreven in *Hoofdstuk 6* is het gebruik van LCFAs door het hart in knock-out (H-FABP<sup>-/-</sup>) muizen vergeleken met cardiaal vetzuurgebruik in wild-type muizen. mRNA niveaus van sarcolemmale vetzuurtransporters bleken niet veranderd te zijn in hartweefsel van H-FABP<sup>-/-</sup> muizen, evenals de capaciteit van H-FABP<sup>-/-</sup> harthomogenaten om octanoaat en palmitaat te oxideren. De afwezigheid van H-FABP in H-FABP<sup>-/-</sup> hartweefsel resulteerde niet in de expressie van andere FABP types, en bracht geen verandering teweeg in de subcellulaire localisatie van mitochondria. Het schijnbaar ontbreken van aanpassingen die de afwezigheid van H-FABP compenseren, maakt de H-FABP knock-out muis uiterst geschikt om de functie van H-FABP in het vetzuurgebruik door het hart te kunnen bestuderen.

Met dit doel voor ogen is de opname en oxidatie van vetzuren door geïsoleerde cardiomyocyten onderzocht. In vergelijking met wild-type cellen blijken H-FABP<sup>-/-</sup> cardiomyocyten verminderd (-45%) in staat palmitaat op te nemen én te oxideren. Dit effect was specifiek voor lang-ketenige (water onoplosbare) vetzuren, daar de opname van het middellang-ketenige (water oplosbare) vetzuur octanoaat even efficiënt verliep in controle en H-FABP<sup>-/-</sup> cardiomyocyten. Contraherende cellen van wild-type muizen vertoonden een verhoogde oxidatie van palmitaat (+95%) ten opzichte van rustende cellen, maar elektrische stimulatie van H-FABP<sup>-/-</sup> cardiomyocyten resulteerde niet in een verhoogde LCFA oxidatie.

Deze experimenten laten zien dat H-FABP betrokken is bij de opname en oxidatie van LCFAs door cardiomyocyten. Omdat compenserende mechanismen blijkbaar ontbreken, kan geconcludeerd worden dat H-FABP bulk transport van LCFAs in het cytoplasmatische compartiment van de cardiomyocyt bevordert. De afwezigheid van H-FABP in H-FABP<sup>-/-</sup> cardiomyocyten beperkt de mate van vetzuurgebruik in deze cellen. De verhoogde oxidatie van glucose door H-FABP<sup>-/-</sup> cardiomyocyten (+80%) en het hogere gehalte aan glycogeen (de tijdelijke opslagvorm van glucose) in H-FABP<sup>-/-</sup> hartweefsel (+60%), suggereert dat H-FABP<sup>-/-</sup> cardiomyocyten voor hun energievoorziening meer gebruik maken van koolhydraten.

Het proefschrift wordt afgesloten met een algemene discussie (*Hoofdstuk 7*). De belangrijkste bevindingen worden besproken en er worden aanbevelingen gedaan voor vervolgonderzoek.